

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学 号: 30520091152226

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

乌菰莓的化学成分及其活性研究

Constituents research of *Cayratia japonica*(Thunb.)

Gagnep and its activite ingredient research

崔 传 文

指导教师姓名: 陈 海 峰 副 教 授

协助指导教师: 陈 全 成 助理教授

专 业 名 称: 化 学 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 5 月 20 日

论文答辩时间: 2012 年 6 月 6 日

学位授予日期: 2012 年 6 月 日

答辩委员会主席: 教授

评 阅 人: 教授

2012 年 5 月 日

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文,并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版),允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索,将学位论文的标题和摘要汇编出版,采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于:

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文, 于
年 月 日解密, 解密后适用上述授权。

() 2. 不保密, 适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文, 未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写, 默认为公开学位论文, 均适用上述授权。)

声明人(签名):

年 月

目 录	
摘要	1
第一章 前 言	2
1.1 本草考证	2
1.2 分布及生活习性	2
1.3 乌菰莓的化学成分研究概况	2
1.3.1 黄酮类	2
1.3.2 挥发油类	4
1.3.3 萜类化合物	6
1.3.4 其 他	7
1.4 乌菰莓生物活性研究进展	8
1.4.1 抗 菌 性	9
1.4.2 抗病毒	9
1.4.3 凝血与免疫作用	10
1.4.4 促生长作用	10
1.4.5 对心脏的作用	10
1.4.6 民间应用	11
1.5 中药抗肿瘤的研究进展	12
1.6 立 题 依 据	13
第二章 乌菰莓活性部位的化学成分研究	17
2.1 药材与仪器	17
2.1.1 实验药材	17
2.1.2 实验仪器	17
2.2 试剂与材料	18
2.3 提取与分离	18
2.3.1 乌菰莓的粗提物的制备	18
2.3.2 化合物的分离	18
2.4 化合物的结构鉴定	21
2.5 本章小结	32
第三章 乌菰莓中化学成分的活性评价	33
3.1 仪器与材料	33
3.1.1 实验仪器	33
3.1.2 主要试剂	33
3.1.3 培养基	33
3.1.4 GST 纯化蛋白所需缓冲液及试剂	34
3.1.5 药物筛选反应液	34
3.1.6 Western blot 及其他实验所用溶液配制	34

3.2 MTT 法检测化合物的细胞毒性	36
3.2.1 实 验 原 理	36
3.2.2 实 验 过 程	36
3.2.3 实 验 结 果	37
3.2.4 结 果 讨 论	39
3.3 探索化合物对肿瘤细胞的凋亡机制	40
3.3.1 实 验 背 景	40
3.3.2 实 验 原 理	40
3.3.3 实 验 方 法	40
3.3.4 实 验 结 果	43
3.3.5 结 果 讨 论	44
3.4 药物的抗纤维化作用的初步研究	45
3.4.1 实 验 背 景	45
3.4.2 实 验 原 理	45
3.4.3 实 验 过 程	45
3.4.4 实 验 结 果	46
3.4.5 结 果 分 析	47
第四章 总结与讨论	48
致 谢	50
参考文献	51
附 录	58

Directory

ABSTRACT	1
CHAPTER I INTRODUCTION	2
1.1 TEXTUAL RESEARCH	2
1.2 DISTRIBUTION AND LIVING HABITS	2
1.3 CHEMICAL CONSTITUENTS OF PROFILE FOR CAYRATIA JAPONICA	2
1.3.1 Flavonoids.....	2
1.3.2 Volatile oil.....	4
1.3.3 Terpene Compounds	6
1.3.4 Others.....	7
1.4 PROGRESS IN BIOLOGICAL ACTIVITY OF CAYRATIA JAPONICA	8
1.4.1 Anti-bacterial	8
1.4.2 Anti-virus	9
1.4.3 Coagulation and immune function.....	10
1.4.4 Growth promoting effect.....	10
1.4.5 For use on the heart.....	10
1.4.6 Civil applications	11
1.5 RESEARCH PROGRESS OF CHINESE MEDICINE ANTI-TUMOR	12
1.6 LITIYIJU	13
CHAPTER II RESEARCH OF CAYRATIA JAPONICA CHEMICAL	
COMPOSITION	17
2.1 MEDICINE AND INSTRUMENTS	17
2.1.1 Experimental medicine	17
2.1.2 Experimental apparatus.....	17
2.2 REAGENTS AND MATERIALS	18
2.3 EXTRACTION AND SEPARATION	18
2.3.1 Preparation of crude extracts of <i>Cayratia Japonica</i>	18
2.3.2 The separation of compounds	18
2.4 STRUCTURAL IDENTIFICATION OF COMPOUNDS	21
2.5 CHAPTER SUMMARY	32
CHAPTER III CAYRATIA JAPONICA ACTIVITY EVALUATION OF THE	
CHEMICAL COMPOSITION	33
3.1 INSTRUMENTS AND MATERIALS.....	33
3.1.1 Experimental apparatus	33

3.1.2 Chemical reagents	33
3.1.3 Medium	33
3.1.4 GSTP urified protein required buffer and reagent	34
3.1.5 Drug screening reaction solution	34
3.1.6 Western blot and other experimental solution preparation	34
3.2 MTT METHOD TESTS COMPOUNDS' CELL TOXICITY	36
3.2.1 Experimental Principles	36
3.2.2 Experimental process	36
3.2.3 Experimental Results	37
3.2.4 The results discussion	39
3.3 EXPLORE THE MECHANISM OF COMPOUNDS ON APOPTOSIS OF TUMOR CELLS	40
3.3.1 Experimental Background.....	40
3.3.2 Experimental Principles	40
3.3.3 Experimental method	40
3.3.4 Experimental Results	43
3.3.5 The results discussion	44
3.4. PRELIMINARY STUDY OF ANTI-FIBROSIS DRUGS	45
3.4.1 Experimental Background.....	45
3.4.2 Experimental Principles	45
3.4.3 Experimental process	45
3.4.4 Experimental Results	46
3.4.5 The results discussion	47
CHAPTER IV SUMMARY AND DISCUSSION	48
ACKNOWLEDGEMENTS.....	50
REFERENCES	51
APPENDIX	58

摘要

乌菰莓是我国传统的中药，在我国具有悠久的用药历史，早在《唐本草》中就有了关于其药理作用的介绍。如今，已知其药理活性多样，临床应用广泛，如治疗腰椎间盘突出，促进生长，抗菌抗病毒等，但对于其抗肿瘤活性方面研究较少。本研究对乌菰莓具有抗肿瘤作用的活性成分进行了初步研究。结果发现，乌菰莓中含有可以明确杀死肿瘤细胞的活性成分。

本文对乌菰莓的 60%乙醇提取物的大孔吸附树脂 60%乙醇和 95%乙醇洗脱部分进行了分离，综合运用硅胶柱色谱、ODS 柱色谱、凝胶柱色谱、分析型 HPLC、制备型 HPLC 及重结晶等方法从以上两个洗脱部分中分离得到了 21 个化合物。通过 NMR、质谱、熔点及理化性质等对化合物的结构进行了鉴定，其中有 17 个化合物为乌菰莓中首次分离。最后从乌菰莓中分离到 21 个化合物，其中有 4 个黄酮类化合物，7 个脂肪酸类化合物，1 个甾体类化合物，1 个香豆素类化合物，3 个糖苷类化合物，5 个其他类化合物。

采用 MTT 法，对化合物的抗肿瘤活性进行了初步的评价。通过细胞毒性试验我们发现化合物 **1**、**2** 和 **17** 具有明显的细胞毒性，随后我们运用 Western blotting 等手段对其凋亡活性进行了深入的讨论，表明化合物 **1** 和 **2** 对与细胞凋亡有关的 AKT 蛋白、PARP 蛋白等均有一定的影响，并且，这两个化合物对成纤维细胞也具有一定的细胞毒性。

本课题首次发现了乌菰莓的抗肿瘤活性并对其机制进行了初步的探索，证明了乌菰莓中所含的成分对于成纤维细胞也具有一定的抑制作用。

关键词：乌菰莓 化学成分 结构鉴定 抗肿瘤 抗纤维化

Abstract

Cayratia japonica (Thunb.) Gagnep is a traditional Chinese medicine. It was first introduced by 《Tang Ben Cao》 and had been used with long history in our country. Today, its diverse pharmacological activity and clinical application is reported on the treatment of lumbar disc, promoting rat growth, antibacterial and antiviral, etc. However, its antitumor activity study is still not concerned. In this study, the anti-cancer components were studied from *Cayratia japonica*.

60% ethanol extract of *Cayratia japonica* was subjected to macro porous adsorption resin column chromatography and 21 compounds were isolated from 60% and 95% ethanol elution with many chromatography methods, such as silica gel, RP-18 gel, Sephadex gel, HPLC and others. The structure of these compounds has been identified based on the data from NMR, MS, melting point and physical properties. 17 compounds are isolated from *Cayratia japonica* for the first time, including 4 flavonoids, 7 Esters, 1 Steroidal, 3 Glycosides, 1 Coumarin and 5 other compounds.

When the subject was just began, we found that some ingredients from *Cayratia japonica* can kill tumor cells. This phenomenon makes us determine that *Cayratia japonica* contains the anti-tumor compositions. Therefore, we first use the MTT assay to carry out a preliminary screening for the anti-tumor activity compounds. Through experiments, we find that compounds **1**, **2** and **17** have significant cytotoxicity. We then used western blotting and other means make a specific study for the apoptotic activity. Experimental results showed compounds **1** and **2** have a certain impact on the AKT protein and PARP protein. And they have cytotoxicity to the fibroblasts.

The subject first discovers *Cayratia japonica* contains anti-tumor activity compositions and studied preliminarily its mechanism. The ingredients that contained in the *Cayratia japonica* also have a certain impact on the fibroblasts.

Keywords: *Cayratia japonica* chemical composition structure identification anti-tumor
anti-fibro

第一章 前言

1.1 本草考证

乌莓是葡萄科植物乌莓 (*Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep) 的全草。其用药历史悠久, 陶弘景首次记述了乌莓的药物作用: 捣敷疮肿, 蛇虫咬处^[1]。始载于《唐本草》: 乌莓, 蔓生, 叶似白莓, 味酸苦, 寒, 无毒。主风毒热肿, 游丹, 蛇伤, 捣敷并饮汁^[2]。另外据《履巉岩本草》记载: 乌莓治痈疽发背, 捣烂罨患处^[3]。宋代《重修政和经史证类备用本草》记载: 乌莓味酸苦寒主风毒热肿、游丹蛇伤捣傅并饮汁^[4]。《本草纲目》对其进行了详细的记载: 乌莓, 滕莖间甚多, 其藤柔而有棱, 一枝一须, 面青背淡; 七、八月结苞成簇, 花大如栗, 黄色; 结实大如龙葵子, 生青熟紫, 内有细子; 其根白色, 大者如指, 长一、二尺, 捣之多涎滑, 主治凉血解毒, 利小便; 根搗酒服, 消疔肿^[5]。另外《江苏植药志》"热水泡, 熏腿可止痛。"《湖南药物志》"治偏头风, 痔疮。"《闽东本草》"治热泻, 血痢"等都有记载^[2]。

1.2 分布及生活习性

乌莓产自陕西、山东、福建、台湾等地。生于山谷林中或山坡灌丛, 海拔 300—2500 米。日本、菲律宾、越南和印度等地也有分布。其主要以沿江堤坡、湿地较大的沙土、沙壤土地段分布较多。一般不与杂草构成群落, 常攀附于他物上^[7]。

1.3 乌莓的化学成分研究概况

乌莓的化学成分研究始见于八十年代, 但此后研究较少, 国内外鲜有文献报道。目前所知其成分多种多样, 主要有黄酮、挥发油、萜类及甾体等成分。现就其主要成分做详细介绍, 具体如下。

1.3.1 黄酮类

黄酮类化合物(flavonoids) 存在于自然界的某些植物和浆果中, 是药用植物中的主要活性成分之一, 人类饮食中含量也很高。泛指两个具有酚羟基的苯环(A 环与 B 环) 通过中间三碳环(C 环) 相互联结而成的具有 $C_6-C_3-C_6$ 结构的一系列化合物。其母核如下^[8]。

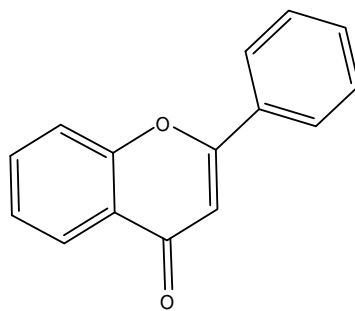


图 1-1 黄 酮 母 核

根据中央三碳链的氧化程度、B 环连接位置（2-或 3-位）以及三碳链是否构成环状等特点，可将主要的天然黄酮类化合物分类：黄酮类、黄酮醇、二氢黄酮类、二氢黄酮醇类、花色素类、黄烷-3,4 二醇类、双苯吡酮类、查尔酮和双黄酮类等十五种。另外，还有橙酮类、新黄烷类化合物，这两种化合物在结构上与以上 12 种稍有差异^[9-10]。

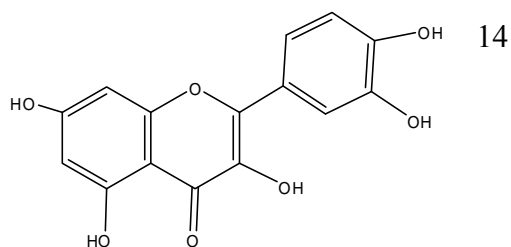
关于黄酮类化合物的活性研究已涉及多个方面，比如黄酮类化合物抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒、抗阿尔茨海默病、降血脂等方面的研究^[11-12]。这对于本课题具有十分重要的意义。

关于乌菰莓中的黄酮类化合物，目前文献报道的主要有黄酮类、二氢黄酮类和黄酮苷等化合物。因为黄酮类化合物的药理作用十分显著，而乌菰莓又有几千年的用药历史，故而研究乌菰莓中的黄酮含量及其种类对于阐述乌菰莓临床应用的具有一定的意义。其具体种类如下：

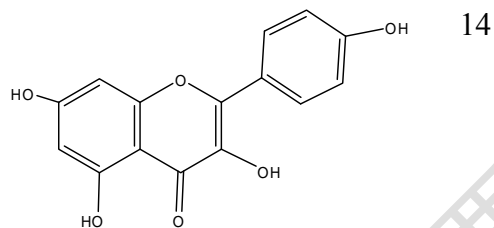
表 1-1

序 号	名 称	结 构	参 考 文 献
1	木犀草素		13
2	芹菜素		13

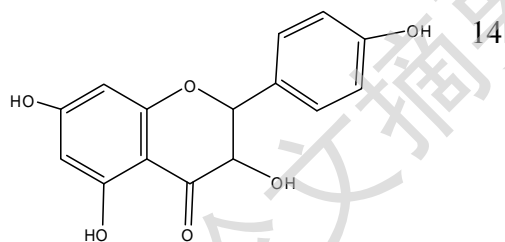
3 槲皮素



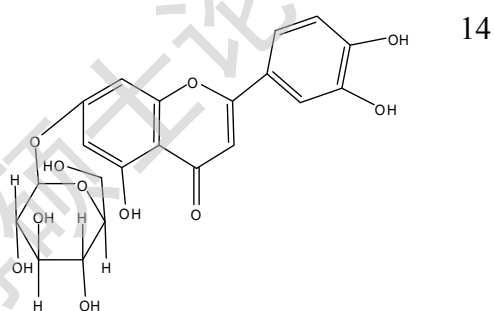
4 aromadendrin



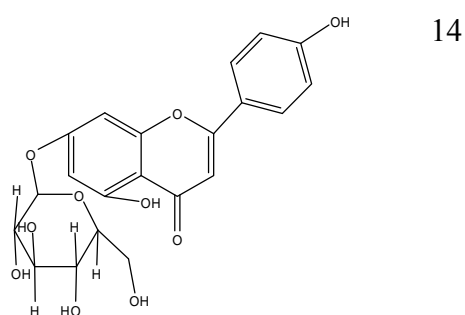
5 花旗松素



6 木犀草苷



7 芹菜素苷



1.3.2 挥发油类

挥发油，又称精油，是一类混合物的总称，其组份较为复杂，故多数无确定的沸点与凝固点。大多数挥发油无色或淡黄色，都具有一些特殊气味，如香气与辛辣味，一般在室温下可挥发。存在于植物的特殊分泌组织中，如薄荷的腺毛、小茴香的油管、橘皮和丁香的油室等。主要含脂肪族、芳香族和萜类三大类化合物。由于挥发油的独特性、合成香料无法代替的天然芳香气味和药理作用，故在食品、化妆品和医疗等行业有广泛的应用^[15-19]。

挥发油的主要活性近年来的研究进展很快。比如近年来，药理实验发现天竺桂挥发油

挥发油对大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 普通变形杆菌 *Proteus vulgaris*、藤黄八叠球菌 *Sarcina lutea* 以及甘蓝黑腐菌 *Xanthomonas campestris*、白菜软腐菌 *Erwinia carotorora* 等均具有较强的抗菌活性^[20-21]。而作为连翘主要成分的 β -蒎烯为连翘水蒸气蒸馏挥发油中的主要成分。具有抑菌、抗炎、抗氧化作用等^[22]。此外,两面针根挥发油不同实验剂量均能有效抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀、显著抑制棉球肉芽肿胀和角叉菜胶致炎的足趾肿胀,能够提高小鼠热刺激体表的痛阈,抑制醋酸刺激腹腔黏膜引起的疼痛反应等功效^[23]。

而据文献报道,乌荑莓中的挥发油成分也比较丰富。且其注射液在鸡胚内对流感病毒有明显抑制作用,临床治疗儿童上呼吸道感染取得明显效果^[24]。目前,已从乌荑莓中鉴定出多种挥发油成分,具体种类见下表:

表 1-2

GC No	Peak (scan)	Compound	Molecular weight	Molecular formula
1	54	Hexadecanoic acid	256	$C_{16}H_{32}O_2$
2	80	(z,z,z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	292	$C_{19}H_{34}O_2$
3	330	4-Hydroxyoctadec-9-enolide	280	$C_{18}H_{32}O_2$
4	461	(z)3-Heven-1-ol	100	$C_8H_{16}O$
5	630	α -Phellandrene	136	$C_{10}H_{16}$
6	681	Sabinene	136	$C_{10}H_{16}$
7	903	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	154	$C_{12}H_{20}O$
8	1008	Camphor	152	$C_{15}H_{24}O$
9	1142	4-Terpinol	154	$C_{12}H_{20}O$
10	1209	α -Terpinol	154	$C_{12}H_{20}O$
11	1406	Piperitone	152	$C_{15}H_{24}O$
12	1475	Bornyl acetate	196	$C_{17}O_2O_2$
13	1577	Dodecyl-cyclotrisiloxane	444	$C_{12}H_{26}O_3Si_3$
14	1637	3,7-Dimethyl-4-(1-methylethyl)-1H-cyclopenta [1,3] cyclopropa [1,2] benzene	204	$C_{15}H_{24}$
15	1658	1,1,7-trimethyl-7-methano-3aH-cyclopentacyclooctene	204	$C_{15}H_{24}$
16	1707	α -Copaene	204	$C_{15}H_{24}$
17	1739	β -Bourbonene	204	$C_{15}H_{24}$
18	1836	alloaromadendrene	204	$C_{15}H_{24}$
19	1860	(R)-1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl)-benzene	202	$C_{15}H_{22}$
20	1881	β -Elemene	204	$C_{15}H_{24}$
21	1970	γ -Cadinene	204	$C_{15}H_{24}$
22	2135	δ -Cadinene	204	$C_{15}H_{24}$
23	2157	4,8-dimethyl-quinoline	157	$C_{11}H_{11}N$
24	2222	1,6,10-Dodecatrien-3-ol-3,7,10-trimethyl	222	$C_{15}H_{26}O$
25	2419	δ -Cadinol	222	$C_{15}H_{26}O$
26	2585	Santalol	220	$C_{15}H_{26}O$
27	2815	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	268	$C_{17}H_{34}O$
28	2861	1-Eicosyne	278	$C_{20}H_{38}$
29	2939	Methyl palmitate	270	$C_{17}H_{34}O_2$
30	3030	1,2-Benzenedicarboxylic acid, buty-2-methylpropylester	278	$C_{18}H_{22}O_4$

体外实验表明, 乌蕊莓挥发油对 HSV-1 的作用主要表现于病毒侵入细胞后的复制阶段, 并随药物的浓度增高而增强。ACV 是目前公认的具有较好的抗 HSV 感染作用^[25-27]。

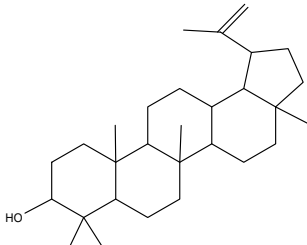
1.3.3 萜类化合物

萜类化合物, 又称类异戊二烯, 是植物界广泛存在的一类天然烃类化合物, 具有异戊二烯单元组成的基本骨架, 通式为 $(C_5H_8)_n$ 。根据所含异戊二烯数目的不同, 萜类可分为单萜 (C_{10})、倍半萜 (C_{15})、双萜 (C_{20})、三萜 (C_{30})、四萜 (C_{40}) 和多萜 ($C>40$) 等。是自然界分布广泛、种类较多的一类植物天然产物, 具有重要的生理学和社会学功能^[28]。迄今已从动物、植物和微生物中分离了 4 万多种萜类化合物^[29-30]。

植物中的萜类化合物按其植物体内的生理功能可分为初生代谢物和次生代谢物两大类。初生代谢萜类化合物包括赤霉素、甾体、胡萝卜素、植物激素、多聚萜醇、醌类等。这些化合物对生物膜系的完整性、光保护、植物生长发育进程及细胞膜系统上的电子传递等功能方面具有重要作用。次生代谢萜类化合物通常具有重要的商业价值, 常被用作食品添加剂、农药和药物等, 尤其该种里的环烯醚萜类具有广泛的应用前景^[31]。近年来随着对环烯醚萜类化合物的深入研究, 发现该类化合物具有多种生物活性, 主要表现为以下几个方面: 对防治心血管疾病的作用、保肝作用、利胆作用、降血糖血脂作用、抗炎作用、解痉作用、抗肿瘤作用、抗血栓和抗氧化作用等^[32-33]。

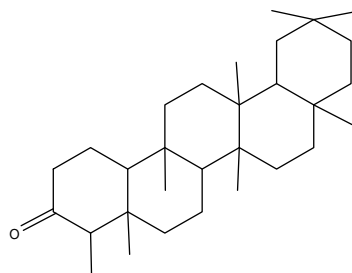
据文献报道, 在乌蕊莓中也发现了萜类化合物的存在, 这对萜类化合物的研究及乌蕊莓的更进一步的应用意义深远, 可在前人研究的基础上更加细致的探索乌蕊莓的药学前景。目前已知从乌蕊莓中分得的萜类化合物主要有:

表 1-3

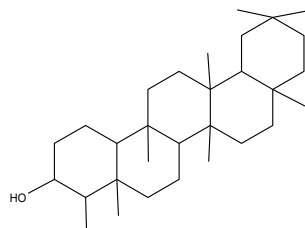
序号	名称	结构	参考文献
1	羽扇豆醇		13

2 无羁萜

34

3 无羁萜-3 β 醇

34

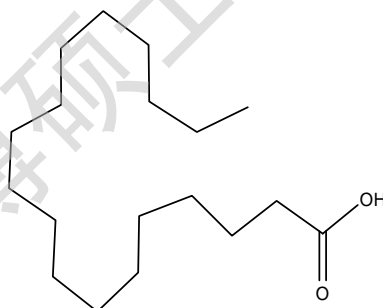


1.3.4 其 他

另外据报道，乌菰莓中还含有以下几种化合物。其具体信息如下表：

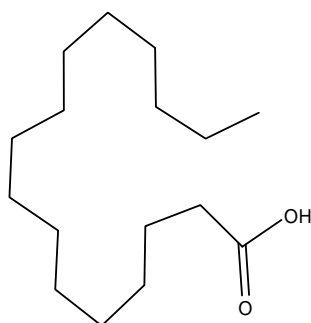
表 1-4

序号	名称	结构	参考文献
1	硬脂酸		13

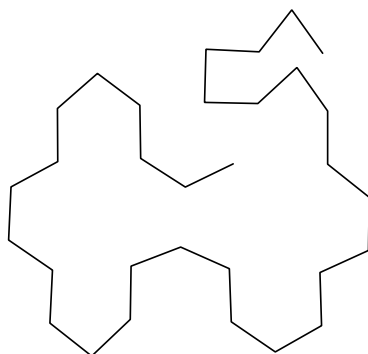


2 棕榈酸

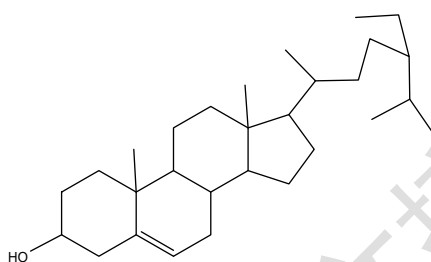
34



3 三十一烷



34

4 β -谷甾醇

13

由上表可知，乌菰莓中含有少量甾醇类化合物，

据报道甾体类化合物是存在于植物和动物中的一大类化合物，这类化合物种类繁多，大都具有重要生理作用。根据其天然来源和生理功能，大致可将甾体类化合物分为：甾醇、胆甾酸、甾体激素、强心苷、甾体皂苷、 C_{21} 甾苷类、甾体生物碱以及昆虫激素等^[35]。其母核如下：

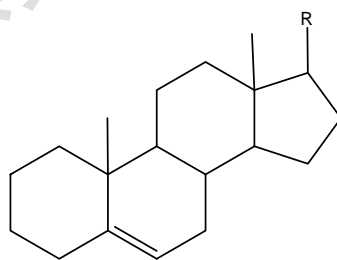


图 1-2 甾体母核

通过对甾体类化合物的结构修饰，可降低或去除其雌活性，使其与体内雌激素竞争结合雌激素受体，从而可减轻雌激素的促细胞增殖作用，降低与雌激素有关的癌症发病危险。对于防治雌激素相关肿瘤具有重要的意义^[36]。

1.4 乌菰莓生物活性研究进展

乌菰莓的药理作用主要是清热利湿、解毒消肿。治痈肿、疔疮、疳腮、丹毒、风湿痛、黄疸、痢疾、尿血、白浊。其临床应用具有悠久的历史，如《草木便方》记载道：清热解毒，涂疮毒，消结核，九子虚气痞，补益虚损^[37]。《分类草药性》也对其功效进行了介绍，主要为：

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库